

B5167/00 A

-2- *

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
la n'utiliser que pour les
commandes de reproduction

(21) N° d'enregistrement national :

2 650 657

90 09894

(51) Int Cl⁶ : F 27 B 17/02.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 2 août 1990.

(30) Priorité : GB. 5 août 1989, n° 8917963.4.

(71) Demandeur(s) : SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.)
Société anonyme FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° G du 8 février 1991.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(72) Inventeur(s) : Daniel Larzul.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Jacques Lachassagne.

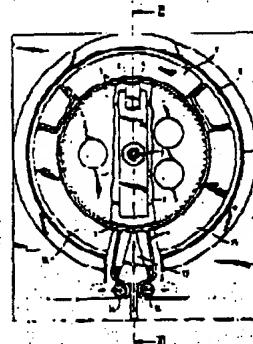
DOC

(54) Appareil destiné à l'exécution automatique et répétée d'un cycle thermique pour le traitement d'échantillons biologiques.

(57) Appareil destiné à l'exécution automatique et répétée d'un cycle thermique pour le traitement d'un échantillon, particulièrement pour un échantillon biologique, comprenant une enceinte 6 close conforme pour constituer un moyen de cheminement de l'échantillon, des moyens 3, 4, 11, 12 pour assurer le déplacement de l'échantillon sur la totalité du moyen de cheminement et des zones à régulation thermique différentes 7, 15, 16 successivement traversées par le moyen de cheminement.

De préférence, l'enceinte qui constitue le moyen de cheminement est un tube capillaire qui peut avoir une forme spirale, former une boucle fermée ou avoir une forme linéaire. Les moyens de chauffage et de refroidissement sont assurés par des zones thermostatées qui peuvent fournir un gradient thermique continu, régulier ou irrégulier, ou constituer un système discontinu. De préférence, le moyen de déplacement de l'échantillon est magnétique.

FR 2 650 657 A1



2650657

- 1 -

L'invention concerne un appareil destiné à l'exécution automatique et répétée d'un cycle thermique pour le traitement d'échantillons biologiques.

Un tel appareil est susceptible de nombreuses applications en biologie, et en particulier en microbiologie. Dans ce dernier domaine, la nécessité de traiter un échantillon biologique à des températures différentes dérive de deux caractéristiques fondamentales. Tout d'abord, l'activité d'une enzyme dépend fortement de la température. Chaque enzyme a une température optimale de fonctionnement et son activité diminue graduellement lorsqu'on s'écarte de cette température. Les courbes qui représentent l'activité enzymatique en fonction de la température sont caractéristiques de chaque enzyme. Ensuite, la réaction d'hybridation moléculaire entre deux séquences d'acides nucléiques est directement liée à la température. Cette hybridation se fonde sur la complémentarité des bases de deux séquences; elle peut se produire entre deux molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN), deux molécules d'acide ribonucléique (ARN) ou entre une molécule d'ADN et une molécule d'ARN. Cette hybridation permet d'obtenir un appariement par formation de liaisons hydrogène, soit entre deux molécules différentes, soit entre deux séquences complémentaires de la même molécule. Dans ce dernier cas, il s'agit d'un arrangement de la molécule d'ARN ou d'ADN qui définit sa structure secondaire. La température joue un rôle essentiel dans l'hybridation et chaque séquence d'ADN (ou d'ARN) est définie par sa T_m , c'est-à-dire la

2650657

- 2 -

température à laquelle 50% des séquences sont appariées à des séquences complémentaires. La T_m d'une séquence donnée est mesurée expérimentalement par spectrophotométrie grâce à l'hyperchromie à 260 nm qui accompagne la séparation (ou la dénaturation) de deux séquences complémentaires d'ADN. 5 Toutes les séquences d'ADN forment une chaîne simple à des températures élevées (100°C), tandis que la chaîne double se forme à basse température (10 à 20°C).

La T_m d'une séquence d'ADN dépend pour l'essentiel de deux 10 facteurs: la séquence proprement dite et la force ionique du milieu. En général, elle est comprise entre 20 et 85°C. La grande majorité des réactions moléculaires peut donc être conduite dans des conditions thermiques parfaitement 15 définies et contrôlées. Certaines de ces réactions exigent d'employer successivement des températures différentes, ce qui peut être obtenu avec l'appareil selon l'invention. Il s'agit, en particulier, de l'hydrolyse au moyen d'enzymes de restriction, de modifications enzymatiques de l'ADN, de réactions enzymatiques en cascade, de l'isolation de 20 séquences répétitives d'ADN et de l'amplification génétique par la réaction en chaîne de la polymérase. Ces applications seront exposées plus en détail ci-après.

Hydrolyse de l'ADN par des enzymes de restriction

Une enzyme de restriction permet de couper une chaîne double ADN/ADN en une position spécifique définie par la 25 séquence. La grande majorité de ces enzymes ont une température d'activité optimale de 37°C. La durée d'incubation, à 37°C, de l'ADN avec l'enzyme varie entre 30 minutes et plusieurs heures. Il est facile d'inactiver 30 l'enzyme par incubation de l'échantillon pendant plusieurs minutes à 100°C, une température à laquelle l'enzyme est dénaturée de façon irréversible.

2650657

- 3 -

5 Ce traitement dénature aussi l'ADN qui reforme une chaîne double lorsque la température est progressivement abaissée de 110 à 20°C. Le refroidissement brutal de l'échantillon ne permet pas d'obtenir un ADN de structure correcte. Un refroidissement progressif peut être réalisé par étapes.

Autres traitements enzymatiques de l'ADN et de l'ARN

La méthode appliquée aux enzymes de restriction peut être adaptée au traitement de nombreuses enzymes, par exemple:

10 - les polynucléotides kinases
- les ligases
- la désoxyribonucléotidyl transférase terminale
- les ADN et ARN polymérasées
- les endonucléases et exonucléases

Traitements enzymatiques en cascade

15 Plusieurs traitements enzymatiques successifs peuvent être nécessaires à l'obtention d'une ou plusieurs séquences définies d'ADN. Une modification du milieu réactionnel est généralement nécessaire entre deux réactions enzymatiques.

Isolation de familles répétitives de séquences d'ADN

20 Certaines séquences d'ADN existent en grand nombre au sein de génomes complexes (le génome humain se compose de 3,5 milliards de paires de bases). Il est possible de distinguer différentes familles répétitives de séquences en fonction du nombre de copies de séquences par génome. Les génomes d'ADN totalement dénaturés thermiquement sont restaurés par étapes de façon sélective. Les séquences très répétitives sont restaurées par étapes de façon sélective. Les séquences très répétitives sont restaurées en premier (famille 1), suivies des séquences moyennement répétitives.

2650657

- 4 -

(familles 2), des séquences peu répétitives (famille 3) et enfin des séquences uniques (famille 4). Il est possible d'isoler ces différentes familles en faisant passer l'échantillon dans des colonnes d'affinité de type hydroxy-apatite, ce qui permet de séparer les ADN à chaîne simple et double. Ces molécules passent dans les colonnes à une température précise lors du refroidissement par étapes de l'échantillon. La température de la première colonne est voisine de la T_m des séquences de la famille 1. Dans ces conditions, les séquences de la famille 1 peuvent être séparées des séquences des familles 2, 3 et 4. Le même procédé s'applique aux séquences des familles 2, 3 et 4. L'appareil selon l'invention est particulièrement bien adapté à la réalisation de cette séquence thermique.

15 Amplification du nombre de séquences d'ADN par la réaction en chaîne de la polymérase (méthode PCR)

Cette technique permet d'amplifier spécifiquement le nombre de copies d'une séquence d'ADN chaîne double. Le principe de cette méthode PCR (R.K. Saiki et coll., Science, 230, 1985, 1350-1354) consiste à employer l'activité de la DNA polymérase DNA dépendante qui initie la synthèse à partir d'oligonucléotides (P1 et P2) ajoutés dans le milieu réactionnel. Un cycle d'amplification se compose de trois étapes successives:

25 - Etape 1

Dénaturation de l'ADN à chaîne double à 90-110°C.

- Etape 2

Hybridation des oligonucléotides "amorces" (15 à 35 nucléotides) P1 et P2 sur les séquences cibles.

30 P1 s'hybride avec la chaîne (+) et P2 avec la chaîne (-). Cette étape est réalisée à une température proche de la moyenne des T_m de P1 et de P2.

2650657

- 5 -

- Etape 3

Synthèse de la chaîne complémentaire d'ADN par extension des amorces P1 et P2, grâce à l'activité d'une ADN polymérase. Cette étape a lieu à une température voisine de 5 la température optimale de fonctionnement de l'enzyme, soit à 37°C pour le fragment Klenow, soit à 72°C pour la Tag polymérase.

Après un cycle d'amplification, le nombre de séquences complétées par P1 et P2 est multiplié par deux; il est multiplié par 4 après 2 cycles, par 8 après trois cycles, 10 par 1024 après 10 cycles et par 1 048 576 après 20 cycles. 15 De façon générale, le taux d'amplification après n cycles est 2^n . Un cycle d'amplification consiste en trois étapes thermiques successives et l'achèvement d'une réaction PCR demande environ 10 à 60 cycles. Chaque étape thermique dure en général de 1 à 5 minutes. L'automatisation de cette technique représente donc un progrès considérable.

20 L'invention concerne un appareil destiné à l'exécution automatique et répétée d'un cycle thermique pour le traitement d'un échantillon biologique; cet appareil comprenant une enceinte close conformée pour constituer un moyen de cheminement d'un échantillon biologique, des moyens pour assurer le déplacement de l'échantillon biologique sur la totalité du moyen de cheminement, et des 25 zones à régulation thermique différente, successivement traversées par le moyen de cheminement.

30 De préférence, l'enceinte qui constitue le moyen de cheminement, est un tube capillaire. Celui-ci peut être réalisé dans un matériau semi-rigide (plastique) et être de petit diamètre de 0,1 à 4 mm environ et de préférence de 1 à 3 mm. Ce petit diamètre interne assure un bon échange de chaleur, qui dépend du rapport entre la surface et le volume, et permet donc des variations rapides de la température, beaucoup plus que pour un échantillon contenu

2650657

- 6 -

dans un tube conventionnel de 0,5 à 1,5 ml. L'échantillon traité dans l'appareil objet de l'invention a un volume habituellement compris entre 1 et 50 microlitres.

5 Divers arrangements du tube capillaire dans l'espace sont envisagés. Il pourrait par exemple avoir une forme en spirale, constituer une boucle fermée ou être linéaire. Chaque tour de la spirale, chaque boucle fermée ou chaque 10 passage de la longueur du tube capillaire linéaire constitue un cycle thermique, dans lequel l'échantillon traverse deux ou plusieurs zones thermostatées à des températures différentes comprises entre 4 et 150°C. Les 15 cycles thermiques suivants (jusqu'à 100) sont réalisés par un nouveau tour de la spirale, un nouveau passage dans la boucle fermée, ou le retour de l'échantillon dans la direction inverse sur la longueur du tube capillaire linéaire.

Les zones thermostatées peuvent être disposées selon un 20 système discontinu ou un système continu. Dans un système discontinu, les zones sont séparées par une barrière physique, qui n'est franchie que par le tube capillaire. Chaque zone dispose d'un système autonome de chauffage ou 25 de refroidissement. La frontière entre zones les isole des effets thermiques de la ou des zone(s) adjacente(s). Dans un système continu, il n'existe pas de barrière physique. Le tube capillaire franchit un gradient de température continu et directionnel qui peut être créé dans un milieu liquide, gazeux ou solide. Un changement de milieu offre la 30 possibilité d'obtenir un gradient de température continu mais irrégulier.

La vitesse de circulation de l'échantillon dans le tube capillaire a un effet important sur le traitement de celui-ci. Si l'échantillon se déplace très lentement dans

2650657

- 7 -

une zone, sa température va atteindre la température de la zone où devenir très proche de celle-ci. L'échantillon peut même être immobilisé dans une zone donnée pendant une durée pré-déterminée, ce qui stabilisera sa température à la température de la zone. Par contre, si l'échantillon se déplace très vite à travers une zone, l'effet thermique de cette zone sur l'échantillon peut être réduit au minimum ou même supprimé.

Le mouvement de l'échantillon dans le tube capillaire peut être obtenu de plusieurs façons:

- par au moins une pompe péristaltique agissant sur une zone à paroi flexible du capillaire;
- par déplacement dans un système magnétique composé de deux parties: un aimant et une partie répondant à l'effet de l'aimant (partie métallique ou second aimant);
L'une des parties est solidement connectée à un système d'entraînement mécanique, permettant sa rotation (système circulaire) ou son déplacement (système linéaire). L'autre partie est située à l'intérieur du capillaire et est solidement connectée à l'échantillon. Cette partie peut consister en au moins une particule solide (globule, cylindre, suspension de microparticules dans un liquide, etc.) ou au moins une particule liquide.
- par un circuit pneumatique;
- par capillarité passive;
- par un effet de pompage thermique créé par la proximité de masses gazeuses à des températures différentes dans le capillaire.

Le mouvement de l'échantillon peut aussi être obtenu par l'association de deux ou plusieurs de ces procédés. Le mouvement de l'échantillon peut être contrôlé par un micropuce.

L'appareil objet de l'invention utilise un système semi-formé, représenté par le capillaire, ce qui réduit le risque de contamination moléculaire lors du traitement de

2650657

- 8 -

l'échantillon biologique.

L'invention est illustrée par référence aux schémas:

Les figures 1a, 1b et 1c sont des représentations

schématiques de l'appareil objet de l'invention, présentant
respectivement les tubes capillaires de forme hélicoïdale,
en boucle fermée et linéaire; la figure 2 est une vue en
coupe, selon la section II-II de la figure 3, d'un appareil
objet de l'invention dans lequel le tube capillaire a une
forme de boucle fermée; et

la figure 3 est une vue en coupe de l'appareil de la
figure 2, selon la section II-II de la figure 2.

La figure 1a, b et c présentent trois schémas. Dans chaque
cas, il existe trois zones thermostatées I, II et III à

travers lesquelles l'échantillon situé dans le tube
capillaire passe au cours d'un cycle thermique. Les zones
thermostatées I, II et III pourraient être remplacées par
un gradient de température continu ou discontinu. Dans la
forme en spirale de la figure 1a, il existe autant de
boucles que de cycles thermiques à réaliser. Dans la forme

en boucle fermée de la figure 1b, il n'existe qu'une seule
boucle: chaque cycle thermique consiste en un tour complet
de l'échantillon biologique dans cette boucle fermée. Dans

la forme linéaire de la figure 1c, le premier cycle
thermique est réalisé par le passage de l'échantillon de la

gauche vers la droite, successivement dans les zones
thermostatées I, II et III. Le second cycle thermique est
réalisé par le retour de l'échantillon de la droite vers la
gauche, à travers les zones thermostatées III, II et I.

Chaque cycle de numéro d'ordre impair ressemble au premier
et chaque cycle de rang pair ressemble au second.

L'échantillon traverse la zone II dans les deux directions,
de sorte qu'on aboutit à la succession de zones

thermostatées I, II, III, III, II, I, I, II, III, III, II,
I... Le passage dans la zone II au cours des cycles

impairs peut toutefois être accompli rapidement pour

fig 1c
linéaire

2650657

- 9 -

minimiser son effet: de plus, la durée de séjour dans les zones I et III peut être ajustée pour obtenir la même séquence I, II, III, I, II, III, I, II, III...qu'avec les arrangements en spirale et en boucle fermée.

5 Dans les figures 2 et 3, l'appareil illustré correspond à l'arrangement en boucle fermée de l'invention, avec un système magnétique de déplacement de l'échantillon biologique et un système discontinu de zones thermostatées.

10 L'appareil est muni d'un tube capillaire 6 qui forme une boucle fermée. Le tube capillaire (6) est muni d'une branche e pour l'entrée de l'échantillon à traiter et d'une branche s pour sa sortie après traitement.

15 La clé (13) peut se déplacer selon l'axe B-B entre une position radiale interieure (le tube capillaire 6 s'appuie sur la paroi 5) et une position radiale extérieure (les branches e et s du capillaire s'appuient sur les éléments 14). Dans la position interieure, la boucle capillaire 6 est interrompue et les branches e et s sont ouvertes pour permettre l'entrée et le retrait de 20 l'échantillon. Dans la position extérieure, les branches e et s sont fermées et l'échantillon peut subir ses cycles dans le capillaire 6, en boucle fermée. La clé 13 est déplacée par des moyens externes à l'appareil, qui ne sont pas illustrés sur le schéma.

25 Un système magnétique est employé pour faire circuler l'échantillon dans le capillaire 6 en boucle fermée. Ce système comprend un aimant 4 porté par un bras 2 retenu par un axe 3. L'axe 3 est supporté en 11 et entraîné par un moteur 12. L'aimant 2 agit sur une partie formée de 30 micro-globules métalliques en suspension dans de l'huile minérale. Cette partie est située dans le tube capillaire 6 en butée avec l'échantillon.

2650657

- 10 -

Au cours d'un tour de l'échantillon dans le capillaire 6 en boucle fermée, il passe à proximité des compartiments thermostatisés 7, 15 et 16. L'échantillon est sous l'influence thermique du compartiment en face duquel il se trouve. Chacun de ces compartiments 7, 15 et 16 est réglé à une température comprise entre 4 et 150°C. Les compartiments sont isolés d'une attache 10, mue par un support 9, d'un espace réglable 8.

Le moteur 12 est contrôlé par un microprocesseur programmable, qui permet de déterminer divers paramètres de l'échantillon. Ces paramètres comprennent le nombre total de cycles auquel doit être soumis l'échantillon, la vitesse de déplacement des échantillons, ainsi que le nombre, l'emplacement et la durée des arrêts de l'échantillon au cours de chaque cycle. Le microprocesseur est interfacé avec un thermocouple qui mesure en permanence la température réelle de l'échantillon dans le tube capillaire 6. Les divers paramètres du mouvement de l'échantillon peuvent donc être réglés en fonction de la température mesurée, sous le contrôle du microprocesseur. Le microprocesseur programmé peut aussi diriger le mouvement des clés 13, régler la température des compartiments 7, 15 et 16 et gérer les appareillages externes, notamment une pompe péristaltique qui dirige le mouvement de l'échantillon dans les branches d'entrée et de sortie. La figure 3 présente trois clés 13 indépendantes, chacune accompagnant un tube capillaire 6.

2650657

- 11 -

RE V E N D I C A T I O N S

- 1.- Appareil destiné à l'exécution automatique et répétée d'un cycle thermique pour le traitement d'un échantillon biologique, cet appareil comprenant:
 - 5 une enceinte close conformée pour constituer un moyen de cheminement d'un échantillon biologique,
 - des moyens pour assurer le déplacement de l'échantillon biologique sur la totalité du moyen de cheminement et
 - des zones à régulation thermique différente, successivement traversées par le moyen de cheminement.
- 10 2.- Appareil, selon la revendication 1, dans lequel l'enceinte constituant le moyen de cheminement, est un tube capillaire.
- 15 3.- Appareil, selon la revendication 2, dans lequel le tube capillaire est réalisé dans un matériau plastique semi-rigide.
- 4.- Appareil, selon les revendications 2 ou 3, dans lequel le tube capillaire a un diamètre interne compris entre 0,1 et 4 mm.
- 20 5.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel l'enceinte qui constitue le moyen de cheminement, se présente sous forme spirale.
- 6.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel l'enceinte, qui constitue le moyen de cheminement, forme une boucle fermée.
- 25 7.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel l'enceinte, qui constitue le moyen de cheminement, est de forme linéaire.

2650657

- 12 -

8.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel les moyens de chauffage et de refroidissement de l'échantillon biologique comprennent deux ou plusieurs zones thermostatées traversées par le moyen de cheminement.

9.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel les zones thermostatées constituent un système discontinu, chacune d'elle étant isolée par rapport à la suivante et disposant d'un système autonome de chauffage et de refroidissement.

10.- Appareil, selon la revendication 8, dans lequel les zones thermostatées constituent un système continu dans l'enceinte du moyen de cheminement, afin de fournir un gradient de température continu et directionnel.

11.- Appareil, selon la revendication 10, dans lequel le gradient thermique est irrégulier.

12.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel le moyen de déplacement de l'échantillon biologique comprend un système magnétique constitué:

d'une partie magnétique dans laquelle l'enceinte du moyen de cheminement et l'échantillon biologique sont adjacents.

d'un aimant externe agissant sur la partie magnétique pour déplacer celle-ci et par la suite l'échantillon.

13.- Appareil, selon la revendication 12, dans lequel la partie magnétique est un aimant solide ou une suspension de microparticules magnétiques dans un liquide non-miscible avec l'échantillon biologique.

2650657

- 13 -

14.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel le moyen de déplacement de l'échantillon biologique met en oeuvre un circuit pneumatique.

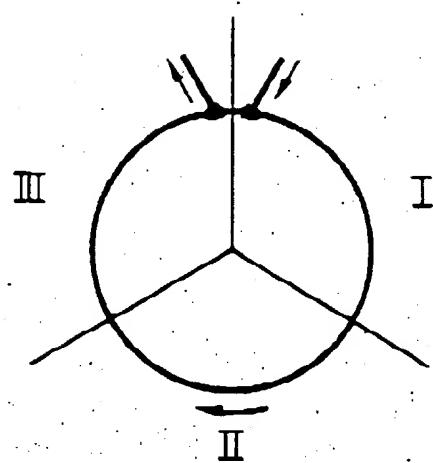
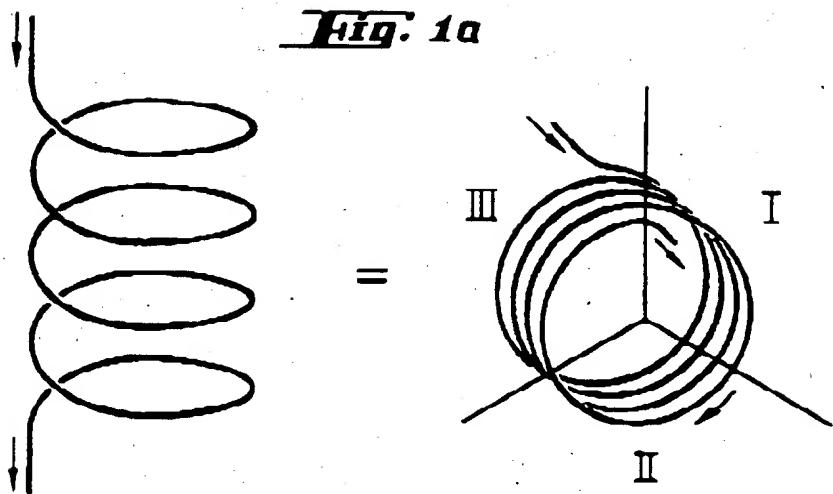
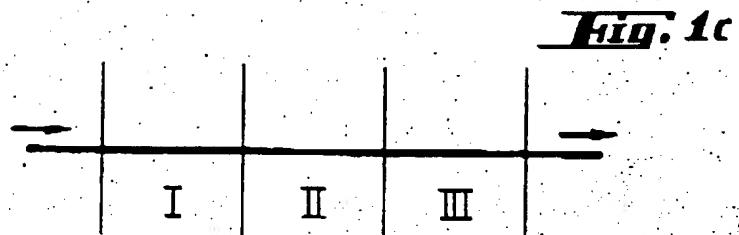
5 15.- Appareil, selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans lequel le moyen de déplacement de l'échantillon biologique utilise l'effet d'un pompage thermique créé par la proximité de masses gazeuses à des températures différentes dans l'enceinte que constitue le moyen de cheminement..

16.- Appareil, selon les revendications 2 à 11, dans lequel le moyen de déplacement de l'échantillon biologique comprend l'effet d'une capillarité passive.

17.- Appareil, selon la revendication 3 à 11, dans lequel le moyen de déplacement de l'échantillon biologique met en oeuvre une pompe péristaltique.

265065?

1/3

**Fig. 1b**

2650657

2/3

B
III

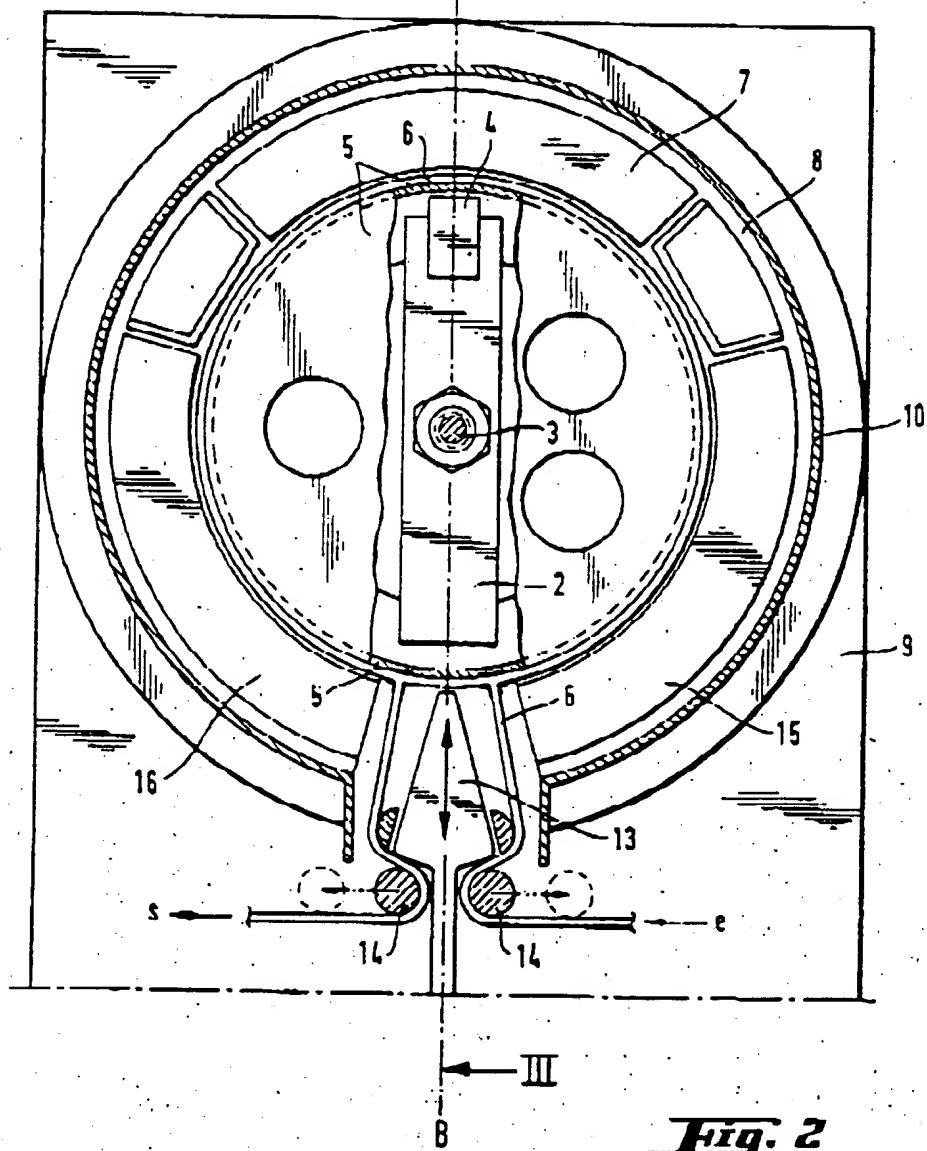


Fig. 2

2650657

3/3

